-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-

For the Detection of the Number of Abasic Sites in Genomic DNA

I はじめに

生物の遺伝情報を保持しているDNAは、複製時のDNA polymeraseのエラーに加えて、環境中の放射線や紫外線、またはアルキル化剤等の化学物質、生体内における活性酸素等の代謝産物により損傷を受ける。これらのエラーや損傷が正しく修復されなければ突然変異を誘発し、これが癌や老化の原因となる。

DNA損傷部位には修復機構が働き、その一つとして塩基除去修復がある。この時AP site (apurinic/apyrimidinic site)と呼ばれる塩基除去部位が出現する。つまりAP siteの検出はDNA損傷部位を測定し得る有効な方法となる。

-Nucleostain- **DNA Damage Quantification Kit**-AP Site Counting- は、AP siteと特異的に結合するARP (*N*'-Aminooxymethylcarbonyl-hydrazino-D-biotin)を用いてDNAをビオチン化し、96穴マイクロプレートに固相化して試料DNA中のAP siteを簡便に定量できるキットである。

本キットには、精製牛胸腺DNAから調製したAP site数の既定されたARP Standard DNAが含まれており、これを用いて検量線を作成することにより試料DNAのAP site数を定量することができる。

II キット内容（20 sample用）

・ARP-DNA Standard Soln. (0, 2.5, 5.0, 10, 20, 40, AP sites / 100,000bp, 0.5 μg/mL)	各250 μL ×1
・ARP Solution	250 μL × 1
・DNA Binding Solution	10 mL × 1
・Washing Buffer	1 pack
・HRP-Streptavidin	25 μL × 1
・TE Buffer	15 mL × 2
・Substrate Solution	10 mL × 1
・Filtration Tube	20 tubes
・96-well Microplate/U bottom	96 well × 1

●キット以外に必要な器具

- 10 μL, 200 μL, 1 mL マイクロピペッター（可変式）
- 200 μL 8連マイクロピペッター（可変式）
- インキュベーター（37℃）
- マイクロプレートリーダー
- 0.5 mL、1.5 mL 遠心チューブ
- 遠心機
- DNA精製キット*
- ペーパータオル

* 本キットによるDNAのAP site数検出は混在するRNAおよびタンパクにより測定誤差を生じる可能性がある。従ってRNase A処理後、RNAと蛋白質を除去する必要がある。
DNA精製方法としてはフェノール/クロロホルム抽出による精製方法があるが、近年数多くのDNA精製キットが市販されるようになり、さらに簡便にDNAを単離精製することが可能となった。
小社でも各種DNA精製キットを販売しております。
(Get *pure* DNA Kit-Agarose, Get *pure* DNA Kit-Blood, Get *pure* DNA Kit-Cell,Tissue)
DNA精製に関するご質問は、小社(フリーダイヤル：0120-489548)までお問い合わせ下さい。

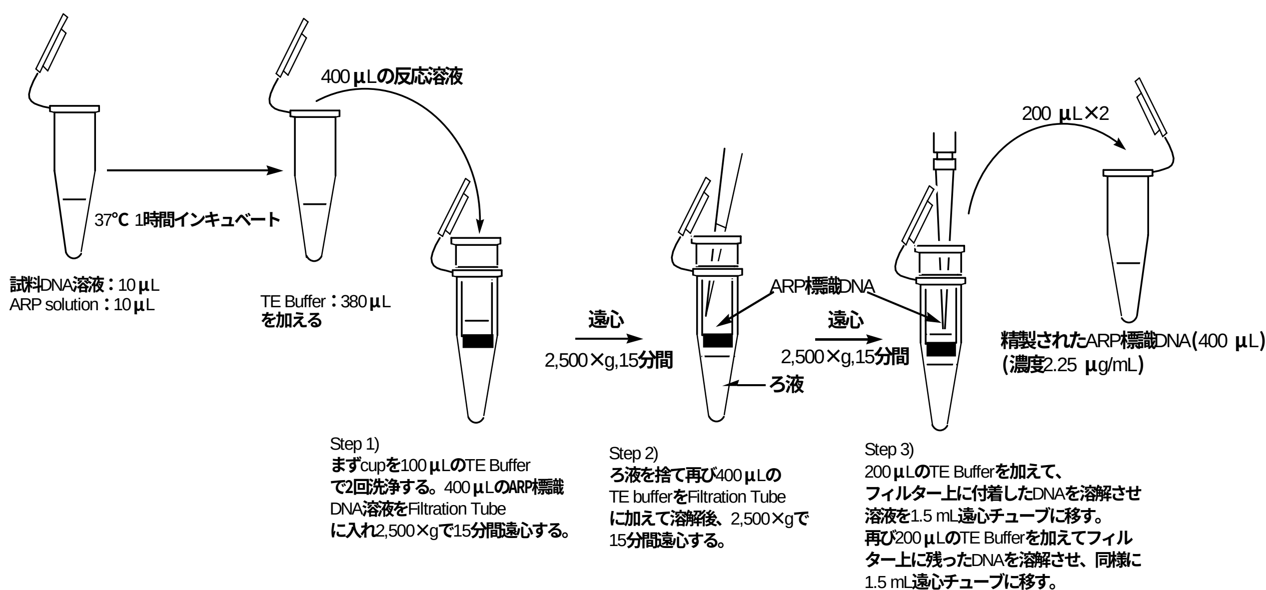


図1 試料DNAのARP標識

III 操作方法

1. 試料DNAのARP標識（図1を参照）

1) 精製した試料DNAをTE Buffer*に溶解させ、溶液の吸光度(260 nm)を測定する。吸光度から濃度を算出して(DNA濃度は50 μg/mLの時の吸光度を1.0として算出)100 μg/mLの濃度になるようにTE Buffer*で希釈調製する。
2) 試料DNA溶液10 μLとARP Solution 10 μLを0.5 mL遠心チューブ中で混合する。
3) 37℃で1時間インキュベートする。その後380 μLのTE Bufferを添加する。
4) まずFiltration Tubeのcupを100 μLのTE Bufferで2回洗浄する。3)の溶液をFiltration Tubeに入れる。
5) 遠心分離（2,500×g、15分間）後、ろ液を捨てる**。
6) 5)のFiltration Tubeに400 μLのTE Bufferを加え、フィルター上に付着したARP標識DNAをピペッティングにより溶解させる(IV-3参照)。
7) 再び遠心分離（2,500×g、15分間）後、ろ液を捨てる**。
8) 7)のFiltration Tubeに200 μLのTE Bufferを加え、フィルター上に付着したARP標識DNAをピペッティングにより溶解させる(IV-3参照)。
9) 溶解させたDNA溶液を1.5 mL遠心チューブに移す。
10) さらに200 μLのTE Bufferを8)のFiltration Tubeに加え8)の操作をもう一度繰り返し、得られたARP標識DNA溶液を8)のDNA溶液と合わせる***。
11) 保存の必要がある場合、1.5 mL遠心チューブに移したARP標識DNA溶液を0～5℃で保存する。

* 本Kitには精製した試料DNAの溶解または、希釈に使用するTE Bufferは含まれていないので以下のように調製する。
TE Buffer(500 mL)：滅菌水500 mLにTrisを606 mg(10 mmol/L)、3NAを206 mg (1 mmol/L) 溶解し、6 mol/LのHClでpHを7.5に調整後、オートクレーブ滅菌する。

** 溶液がメンブラン上に残っている場合は、更に2,500×g、5分間遠心分離する。

*** Filtration Tubeを使用した場合のDNA回収率は90%である。よって溶液中のARP標識DNA濃度は2.25 μg/mLとなる。

2. AP site数の検出

1) III-1で調製したARP標識DNA 90 μLを1.5 mL遠心チューブに入れ、TE Buffer 310 μLを加える。
2) 各ARP-DNA Standard Soln.を1 well当たり60 μLずつ3 wellに添加する（図2参照）。
3) 1)で調製したARP標識DNAを1 well当たり60 μLずつ3 wellに添加する。
4) DNA Binding Solution 100 μLをDNAの入ったwellに添加し数回ピペッティングした後、室温に一夜放置する。
5) 添付のWashing Buffer 粉末をイオン交換水1 Lに溶解して洗浄用PBSTを調製する。
HRP-Streptavidinを洗浄用PBSTで4,000倍に希釈し、希釈HRP-Streptavidinを調製する（例 HRP-Streptavidin 10 μL +PBST 40 mL）。
6) well中の溶液を吸引などにより除去し、洗浄用PBST 250 μLでプレートを洗浄する。再びwell中の溶液を吸引などにより除去し、ペーパータオルの上でプレートを叩いてwell中の残存溶液を完全に除く。この操作を5回繰り返す。
7) 希釈HRP-Streptavidin 150 μLを各wellに添加し、37℃、1時間インキュベートする。
8) 6)と同様にして、洗浄用PBST でプレートを5回洗浄する。
9) Substrate Solution 100 μLを各wellに添加し、37℃、1時間インキュベートする。
10) マイクロプレートリーダーにより、吸光度を測定する。630～670 nmの波長フィルターが使用可能である。
11) DNA中のAP site数を検量線から算出する（図3）。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0 ARP-DNA std.			sample 1	sample 5			sample 13			
B		2.5 ARP-DNA std.				sample 6			sample 14			
C		5 ARP-DNA std.				sample 7			sample 15			
D		10 ARP-DNA std.			sample 2	sample 8			sample 16			
E		20 ARP-DNA std.				sample 9			sample 17			
F		40 ARP-DNA std.				sample 10			sample 18			
G		blank	sample 3			sample 11			sample 19			
H			sample 4			sample 12			sample 20			

ARP-DNA Standard Soln.あるいはARP標識DNA(60 μL)とDNA Binding Solution (100 μL)
blank：60 μL TE Buffer+100 μL DNA Binding Solution

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C				Washing								
D				希釈HRP-Streptavidin								
E				Substrate Solution								
F												
G												
H												

1, 洗浄（250 μL/well)×5
2, 希釈HRP-Streptavidin 添加 (150 μL/well)
3, 洗浄（250 μL/well)×5
4, Substrate Solution 添加 (100 μL/well)

図2 プレート配置図

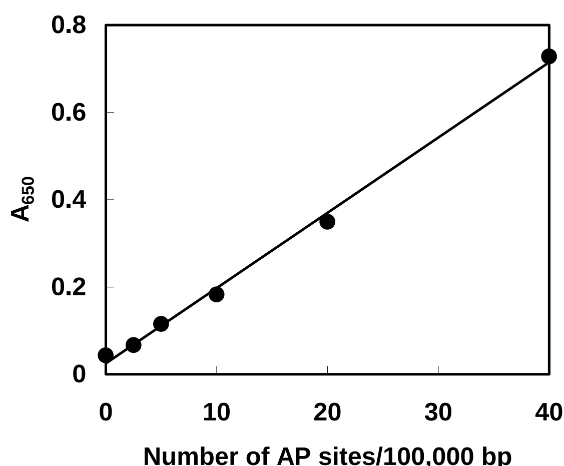


図3　ARP-DNA Standard Soln.を用いて作成した検量線例

IV 注意事項

1. キットは0～5℃で保存し、凍結させないで下さい。
2. 試料DNAのAP siteは一般に不安定ですので、測定対象DNAを単離精製後は直ちにARP標識を行ってください。ARP標識DNA溶液は0～5℃で1年安定です。
3. Filtration Tubeでの遠心分離後は直ちにTE Bufferを添加しDNAを溶解させてください。長時間DNAをメンブラン上で放置しておきますと、DNAのメンブランへの吸着が起こり回収率にバラツキを生じる可能性があります。
4. γ線滅菌のチューブはDNAの吸着を生じる可能性がありますので、チューブを使用の際は非滅菌チューブを必要に応じてオートクレーブ滅菌して使用することを推奨します。
5. 630～670 nmのフィルターを持ち合わせていない場合は、発色反応後、各wellより50 μL抜き取り新しいプレートに移します。同量の1 mol/L 硫酸を添加後、450 nmの吸光度で測定することができます。硫酸添加後、速やかに測定してください。
6. well洗浄後、残存する溶液により測定誤差を生じることがありますので完全に除いてください。

参考文献

1) Sancar, A. and Sancar, G. B., *Annu. Rev. Biochem*., **57**, 29 (1988).
2) Lindahl, T. and Nyberg, B., *Biochemistry*, **11**, 3610 (1972).
3) Liuzzi, M. and Talpaert-Borle, M., *J. Biol. Chem*., **260**, 5252 (1985).
4) Weinfeld, M., Liuzzi, M. and Paterson, M. C., *Biochemistry*, **29**, 1737 (1990)
5) Chen, B. X., Kubo, K., Ide, H., Erlanger, B. F., Wallace, S. S. and Kow, Y. W., *Mutat. Res*., **273**, 253 (1992).

トラブルシューティング

A.発色しないあるいは発色が極端に少ない

1. 試料DNAのプレートへの固定にDNA Binding Solutionを使用しましたか。不十分な量のDNA Binding Solutionを使用するとDNAがプレートにうまく固定されません。
2. 1/4,000に希釈したHRP-Streptavidin溶液を使用しましたか。
3. Substrate Solutionを加えましたか。
4. 正しい波長で測定していますか。
5. 希釈HRP-Streptavidin溶液は使用直前に調製しましたか。この溶液は長時間の保存には適しません。
6. HRP-Streptavidin溶液は適温(0～5℃)で保存されましたか。室温あるいは冷凍状態での保存は酵素活性を著しく低下させます。

B.試料DNAが発色しない

1. 用意した試料DNAの濃度は100 μg/mLでしたか。
2. 試料DNAは精製しましたか。
3. 試料DNA溶液にARP Solutionを加えましたか。
4. ARP標識後、Filtration Tubeを用いて精製しましたか。
5. 試料DNA中のAP site数が検出限界である1/100,000bpより少なくありませんでしたか。

C.全てのwellの発色が強すぎる

1. HRP-Streptavidin溶液は、洗浄用PBSTで1/4,000に希釈しましたか。高濃度のHRP-Streptavidin溶液は高バックグラウンドの原因になります。
2. 洗浄用PBSTで各wellを5回ずつ洗浄しましたか。

D.検量線が直線にならない／ばらつきが大きい

1. 各ARP-DNA Standard Soln.を同量ずつ使用しましたか。
2. 洗浄用PBSTで各wellを5回ずつ洗浄しましたか。
3. 洗浄時に洗浄用PBSTを完全に除きましたか。洗浄用PBSTを除いた後、完全に水気を取るためにペーパータオルの上でプレートを逆さにして数回叩いてください。
4. 洗浄用PBSTはキット付属のWashing Buffer粉末を純水1 Lに溶解したものを使用して下さい。高濃度あるいは低濃度の洗浄用PBSTを使用すると大きな誤差を生じることがあります。
5. DNAのプレートへの固定のため、プレートを室温で一晩放置しましたか。DNAを十分固定するためには少なくとも4時間のインキュベートが必要です。
6. ARP標識後の精製はFiltration Tubeを用いた方法で行いましたか。ARPのコンタミネーションは測定に重大な問題を引き起こす可能性があります。
7. 1サンプルに1つのFiltration Tubeを使いましたか。

E.試料DNAの測定で測定可能レンジを超える

1. Filtration Tubeで精製した後、DNA溶液をTE Bufferで希釈しましたか。
2. 取り出した試料 DNA は十分精製されていますか。

<開発元>
Dojindo Molecular Technologies, Inc.
211 Perry Parkway, Suite 5, Gaithersburg, MD 20877
Telephone : +1-301-987-2667　Fax : +1-301-987-2687
URL : http://www.dojindo.com/

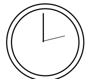
<委託製造元>
株式会社同仁化学研究所
Tel: 096-286-1515(代表)　Fax: 096-286-1525
ドージン・イースト (東京)
Tel: 03-3578-9651(代表)　Fax: 03-3578-9650

General Protocol at a Glance

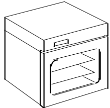
このGeneral Protocolを使用する前に取扱説明書を良くお読みください

Day 1

Step 1)

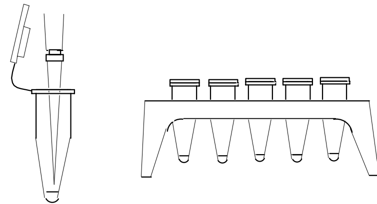


1 hour



37 °C

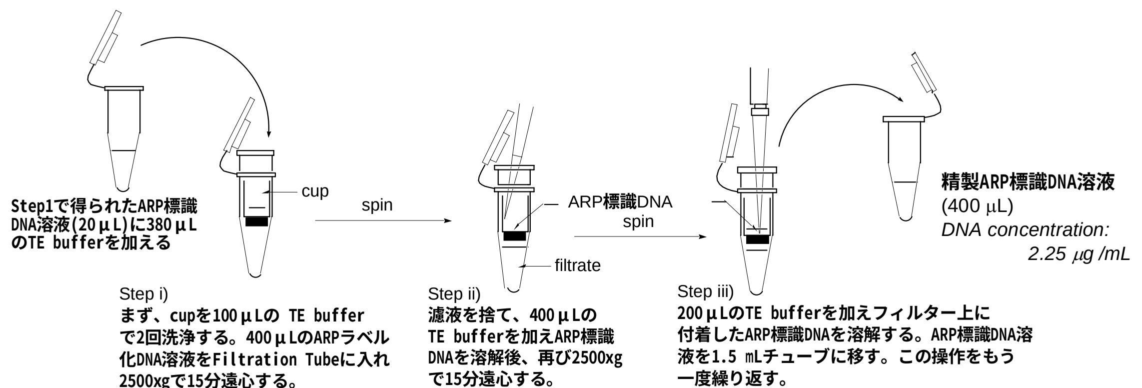
10 µL[a] **の 試料**DNA**溶液と**10 µL[a] **の** ARP Solution**を混合し** 37 °C**で**
1**時間インキュベートする。**



a)**もし試料**DNA**溶液が**10 µL**より少なかったら同量の**
ARP Solution**を加えること**

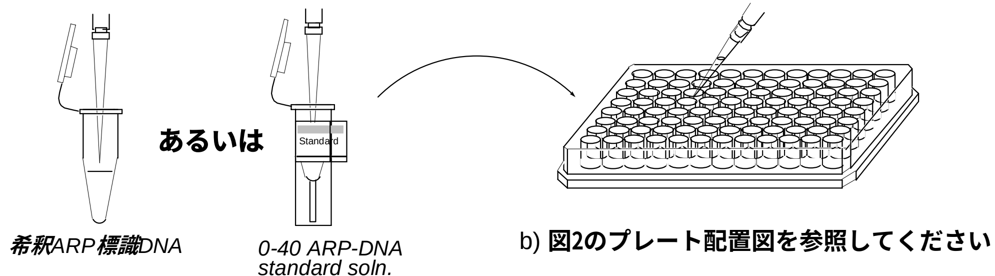
Step 2)

ARP**標識**DNA**を**Filtration tube**で精製する。**



Step 3)

90 µL**の**ARP**標識**DNA**溶液をチューブに取り、**310 µL**の**TE buffer**で希釈する。**
60 µL**の希釈溶液、あるいは**ARP-DNA standard soln.**を**well**に加える**[b]**。**

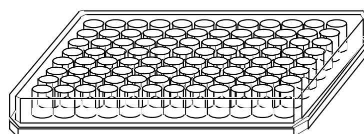


Step 4)



overnight

100 µL**の**DNA binding solution**をそれぞれの**well**に加え、数回ピペッティングしたのち**
室温で一晩放置する。



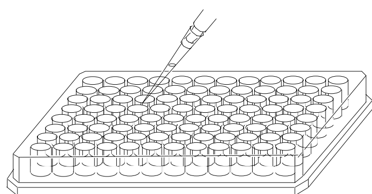
General Protocol at a Glance

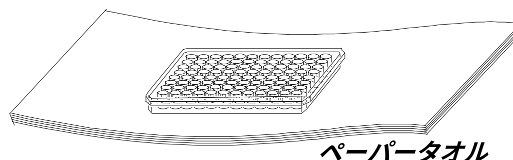
このGeneral Protocolを使用する前に取扱説明書を良くお読みください

Day 2

Step 5)

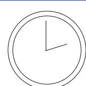
well中の溶液を除去し、洗浄用PBST 250 µLでプレートを5回洗浄する。この時well中の残存溶液を完全に除くため、ペーパータオルの上でプレートを逆さにしてたたくと良い。



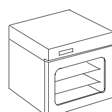


Step 6)

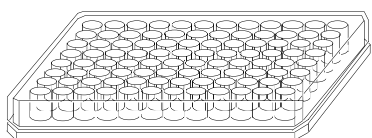
希釈HRP-Streptavidin[c] 150 µL を各wellに添加し37 °Cで1時間インキュベートする。



1 hour



37 °C



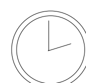
c) 1/4000 に希釈したHRP-Streptavidin溶液を使用すること
調製は以下のように行う。
10 µLのHRP-Streptavidinを40 mLの洗浄用PBST
に添加し良く混合する。この溶液は用時調製すること。

Step 7)

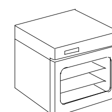
Step 5)と同様にして、洗浄用PBSTでプレートを5回洗浄する。

Step 8)

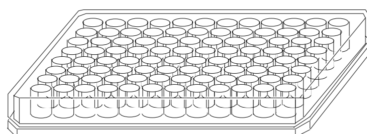
100 µLのSubstrate Solutionを各wellに添加し37 °Cで1時間インキュベートする。



1 hour

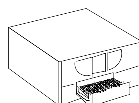


37 °C



Step 9)

マイクロプレートリーダーで650 nm[d]の吸光度を測定する。DNA中のAP site数を検量線から算出する。



d)もし650 nmのフィルターを持ち合わせていない場合、発色後各wellより50 µLづつ抜き取り新しいプレートに移し、50 µLの1 M硫酸を添加し450 nmの吸光度を測定することが出来ます。